

**تأثیر ضد سرطانی کمپلکس‌های جدید پالادیوم بر روی رده‌ی سلولی
سرطان مری (KYSE-۳۰)**

دکتر نوروز نجف‌زاده^۱، شهرام هادی‌زاده^۲، دکتر محمد مازنی^۳، دکتر محتبی امانی^۴، دکتر حسن منصوری ترشیزی^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: برای درمان بدخیمی‌ها می‌توان از روش‌های جراحی، پرتو درمانی، دارو درمانی و یا ترکیبی از این روش‌ها استفاده کرد. دارو درمانی در بیماران سرطانی شامل شیمی درمانی، بیوتراپی و استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر علیه برخی آنتی‌ژن‌های سلول بدخیم می‌باشد. از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سامان‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد، کمپلکس‌های فلزات سنگین می‌باشند و مطالعه‌ی حاضر نیز با هدف بررسی تأثیر ضد سرطانی کمپلکس‌های پیریدین‌یاد یوم بر روی رده‌ی سلول سرطان مری انجام شد.

روش‌ها: کمپلکس‌های جدید پالادیوم به نام‌های $[PdCl_2]^{2-}$ -۱،۳- الکیلن بیس (دی‌تیوکربامات) بیس (۱،۱۰- فانترویلین پالادیوم(II) نیترات (که الکیلن می‌تواند پروپیلن (کمپلکس ۱)، بوتیلن (کمپلکس ۲) و یا اکتیلن (کمپلکس ۳) باشد) در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان سنتز شد و به منظور بررسی اثرات ضد سرطانی آن در مقایسه با داروی بیسیس پلاتین بر روی ردهی سلول سرطانی مری (KYSE-۳۰)، از روش‌های MTT ($5,2$ -diphenyltetrazolium bromide - $(5,4$ -Dimethylthiazol- 2 -yl)-۳-ارزیابی کلونی استفاده شد و همچنین برای بررسی نوع مرگ سلولی (آپوپتوز یا نکروز) از رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیومیو بر مایه استفاده گردید.

یافته‌ها: IC50 به دست آمده از تیمار سلول‌ها با کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ در پایین‌تر از سیس پلاتین بود و همچنین رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید نشان داد که این ۳ کمپلکس جدید، اثرات سیتوتوکسیک خود را از طریق القای آپوپتوز سلولی اعمال می‌کنند. مقایسه‌ی تعداد کلونی‌های شکل گرفته بعد از تیمار با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های پالادیوم، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($P < 0.001$).

نتیجه گیری: اثرات ضد سرطانی این ۳ کمپلکس بر روی رده‌ی سلولی ۳۰-۱YS بیش از داروی سیس پلاتین می‌باشد و حتی استفاده از غلظت‌های پایین کمپلکس‌های پالادیوم می‌تواند باعث کاهش تعداد کلونی و القای مرگ سلولی انحصاری آپوپتوز شود که می‌توان از آن در صورت انجام تحقیقات تکمیلی بعدی، به عنوان داروی جایگزین در درمان سرطان مری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: رده‌ی سلولی KYSE-۳۰، کمپلکس‌های جدید پالادیوم، کلونی، آپوپتوز، نکروز

ارجاع: نجف‌زاده نوروز، هادی‌زاده شهرام، مازنی محمد، امانی مجتبی، منصوری ترشیزی حسن. تأثیر ضد سرطانی کمپلکس‌های جدید بالادایوم بر روی رده‌ی سلولی سرطان مری (۳۰-KYSE). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۴): ۲۲

- ۱- استادیار، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۴- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی پزشکی و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
- ۵- استادیار، گروه شیمی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

Email: shahramhadizadeh@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤول: شهرام هادی‌زاده

مقدمه

برای درمان بدخیمی‌ها می‌توان از روش‌های جراحی، پرتو درمانی، دارو درمانی و یا ترکیبی از این روش‌ها استفاده کرد. دارو درمانی در بیماران سرطانی شامل شیمی درمانی، بیوترایی و استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال بر علیه برخی آنتی‌ژن‌های سلول بدخیم می‌باشد (۱). از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سلول‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد، کمپلکس‌های فلزات سنگین می‌باشند (۲-۴) در دهه‌ی ۱۹۶۰ با مطالعات گسترده‌ای که روی موش‌های آزمایشگاهی صورت گرفت، مشخص گردید که سیس پلاتین دارای خاصیت ضد سرطانی است و ایزومر ترانس آن فاقد این اثر و غیر فعال می‌باشد. به دنبال مطالعات و آزمایش‌های کلینیکی وسیع، سیس پلاتین به عنوان یک داروی ضد سرطان توسط اداره دارو و غذای آمریکا مورد قبول قرار گرفت. از سال ۱۹۹۹ میلادی یکی دیگر از آنالوگ‌های سیس پلاتین یعنی اگزالی پلاتین به همراه ۵-فلورو اوراسیل یا لکورین برای درمان سرطان روده‌ی بزرگ در اتحادیه‌ی اروپا استفاده شد.

در حال حاضر نیز از سیس پلاتین به عنوان یک داروی ضد سرطان در درمان بدخیمی‌هایی همچون سرطان بیضه، تخمدان و تومورهای سر و گردن استفاده می‌گردد. در بین داروهای شیمی درمانی مشتق از پلاتینیوم و پالادیوم، بیشتر روی مکانیسم و عملکرد سیس پلاتین مطالعه شده است (۵-۶). اختلال در همانندسازی DNA، اثر عمده‌ای است که سیس پلاتین در سلول توموری ایجاد می‌کند و همین ایجاد اختلال در همانندسازی DNA است که سبب خاصیت ضد سرطانی سیس پلاتین شده است.

توانایی سیس پلاتین در اتصال کووالانسی به DNA و توقف عمل DNA پلیمراز، باعث توقف چرخه‌ی سلولی و مرگ سلولی می‌شود. به علت وجود اثرات جانبی اکثر داروها و ترکیبات ضد سرطانی از جمله سیس پلاتین مانند آسیب‌های شنوایی، آسیب‌های کلیوی، آسیب‌های دستگاه گوارش و مغز استخوان، همواره تلاش‌های زیادی برای یافتن داروها و کمپلکس‌هایی با قدرت ضد سرطانی بالا و اثرات جانبی کمتر صورت گرفته است.

یکی از راه‌های کاهش اثرات جانبی ترکیبات حاوی فلزات سنگین، استفاده از کمپلکس‌های حاوی لیگاند سولفوردار مانند سیستئین، پنسیل آمین، میتونین، تیوره، تیوسولفات و به خصوص لیگاند شلاته کننده‌ی دی‌اتیل دی‌تیو کاربامات می‌باشد که این لیگاندها باعث کاهش سمیت فلزات سنگین بر علیه و دیگر بافت‌های بدن می‌شوند. رویکرد دیگر، استفاده از فلزاتی است که خاصیت سمی کمتری بر روی بافت‌های سالم در مقایسه با فلز پلاتین داشته باشند. همچنین، استفاده از دیگر فلزات گروه پلاتین نظیر پالادیوم، اسموم و ایریدیوم در تحقیقات مورد توجه قرار گرفت.

مزیت کمپلکس‌های جدید مورد استفاده در این مطالعه، وجود ریشه‌های دی‌تیو کربامات می‌باشد که بنا به گزارش‌ها، باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می‌شود و همچنین فلز پالادیوم به کار رفته در این کمپلکس‌ها نیز دارای اثرات جانبی کمتری به نسبت فلز پلاتین می‌باشد. وجود ساختار ۱، ۱۰-فانترویلین در ساختمان مولکولی این ۳ کمپلکس پالادیوم، باعث شده است پیوند این مولکول‌ها با DNA از نوع پیوند اینترکالیشن باشد. در پیوند

گروه‌ها

در روش MTT (۳-(۵,۴-Dimethylthiazol-۲-yl) diphenyltetrazolium bromide، -۵,۲-، گروه‌هایی که در ارزیابی کلونی و بررسی مرگ سلولی استفاده شد، به شرح زیر است:

الف) گروه شاهد که تحت تأثیر هیچ گونه دارویی قرار نگرفت.

ب) گروه مورد (Treatment) که در این گروه سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های $0-64 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ برای MTT و $0-8 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ برای ارزیابی تعداد کلونی و ارزیابی نوع مرگ سلولی قرار گرفتند.

ج) گروه مقایسه که در این گروه داروی سیس پلاتین در شرایط به طور کامل یکسان، با کمپلکس‌های پالادیوم مورد مقایسه قرار گرفت.

کشت سلولی

رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ از شرکت انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط RPMI-۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute، ۱۶۴۰) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، و محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شد و سپس در انکوباتور، در دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ درصد نگهداری شد.

روش MTT

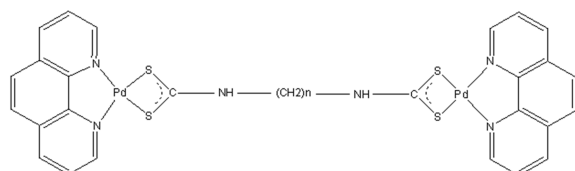
برای انجام MTT ابتدا سلول‌های رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ توسط محلول حاوی تریپسین-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic- Trypsin) از کف پلیت جدا و با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو و در غلظت 1×10^4 سلول در $200 \mu\text{l}$ در

اینتراکالیشن یک قسمت مسطحی از مولکول بین بازهای موجود در DNA قرار می‌گیرد و در نتیجه، مانع از رونویسی و همانندسازی DNA می‌شود (۷، ۱). از این رو، با توجه به گزارش‌های قبلی مبنی بر حساسیت سرطان‌های دستگاه گوارش به شیمی درمانی و کمتر بودن اثرات جانبی کمپلکس‌های پالادیوم حاوی گروه‌های دی‌تیول بر روی سلول‌های کلیه، در این مطالعه برای اولین بار تأثیرات ضد سرطانی این کمپلکس‌ها را روی سلول‌های سرطان مری مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

داروها

کمپلکس‌های پالادیوم زیر در آزمایشگاه شیمی دانشگاه سیستان و بلوچستان مشابه پروتکل گزارش شده ساخته شد (۸). ساختار مولکولی این ۳ ترکیب در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. ساختار شیمیایی کمپلکس‌های جدید پالادیوم که n

می‌تواند اعداد ۳ (کمپلکس ۱)، ۴ (کمپلکس ۲) و ۸ (کمپلکس ۳) باشد.

کمپلکس ۱: $1-3 \mu\text{M}$ - پروپیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱۰، ۱) - فنانترولین پالادیوم (II) نیترات کمپلکس ۲: $1-4 \mu\text{M}$ - بوتیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱۰، ۱) - فنانترولین پالادیوم (II) نیترات کمپلکس ۳: $1-8 \mu\text{M}$ - اوکتیلن بیس (دی‌تیو کربامات) بیس (۱۰، ۱) - فنانترولین پالادیوم (II) نیترات

۱۰ درصد FBS کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C با رطوبت کافی و CO_2 ۵ درصد نگهداری گردید.

سپس سلول‌ها با غلظت‌های $0-8 \mu\text{g/ml}$ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ تیمار داده شدند و به مدت هفت روز دیگر انکوبه گردیدند. در طول این هفت روز، هر ۴۸ ساعت محیط‌های کشت آسپیره و دوباره با محیط کشت جدید حاوی دوز مشابه جایگزین می‌شدند. محیط کشت موجود در ول شاهد نیز در طول این هفت روز هر ۴۸ ساعت با محیط کشت جدید جایگزین گردید.

در پایان این هفت روز، محیط کشت آسپیره و سلول‌ها دو بار با محلول PBS شستشو داده شد و کلونی‌های ایجاد شده با متانول ۰/۵ درصد فیکس و با رنگ کریستال ویوله‌ی ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس پلیت‌ها با آب مقطر شستشو و در دمای اتاق خشک گردیدند. در نهایت، از کلونی‌های ایجاد شده در پلایت‌ها عکس تهیه گردید و توسط نرم‌افزار Image J کلونی‌ها شمارش شدند و IC_{50} محاسبه گردید.

رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید

رده‌ی سلولی سرطان کبدی (KYSE-۳۰)، در پلیت فلاسک T۲۵ کشت داده شدند. بعد از گذشت یک هفته، با تریپسین جدا و پس از سانتریفوژ، تعداد ۱۲۰۰۰ سلول در هر پلیت شش خانه به مدت هفت روز کشت داده شدند. روز اول محیط کشت سلول‌ها با دوزهای مختلف از ۳ نوع کمپلکس پالادیومی تعویض شد. بعد از هفت روز، سلول‌ها با مخلوط رنگ آکریدین اورنج ($100 \mu\text{g/ml}$) و اتیدیوم بروماید ($100 \mu\text{g/ml}$) رنگ‌آمیزی شدند و بعد از ۵ دقیقه با میکروسکوپ فلورسنت مدل امپوس، تصاویری

داخل پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس محیط آسپیره گردید. ردیف اول پلیت ۹۶ خانه‌ای به عنوان بلانک، ردیف دوم به عنوان شاهد و ردیف‌های بعدی به ترتیب با غلظت‌های $0/5, 0/125, 0/1, 0/2, 0/4, 0/8, 0/16, 0/32$ و ۶۴ از کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ تیمار گردید.

در این مرحله، از محیط کشت بدون FBS (Fetal bovine serum) استفاده شد و دوباره پلیت‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. چهار ساعت قبل از اتمام زمان انکوبه محیط کشت آسپیره شد و $180 \mu\text{l}$ محیط بدون FBS و $20 \mu\text{l}$ از رنگ MTT (5 mg/ml) به هر ول اضافه گردید و پلیت‌ها برای چهار ساعت دیگر انکوبه و بعد از آن محیط رویی آسپیره شد و $180 \mu\text{l}$ از محلول دی‌متیل سولفوکسید (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) به هر ول اضافه و پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه Shake گردیدند و جذب در 570 nm توسط الیزا ریدر اندازه‌گیری شد.

در نهایت، میزان بقای سلولی در پلیت ۹۶ خانه‌ای با استفاده از فرمول $100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های شاهد} \div \text{جذب نوری سلول‌های مورد})$ محاسبه و میزان IC_{50} با برنامه‌ی Sigma plot نسخه‌ی ۱۲ محاسبه گردید.

روش ارزیابی تعداد کلونی

برای انجام کلونی کانت سلول‌های مربوط به رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ را از ته پلیت توسط تریپسین-EDTA جمع‌آوری و سپس با FBS شستشو داده و در پلیت‌های شش خانه در غلظت ۵۰۰ سلول در هر ول به همراه ۲ cc محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حاوی

تهیه گردید.

هسته‌ی سلول‌های آپوپتوتیک متراکم و قطعه قطعه شده و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل تمایز بودند، علاوه بر آن در این روش، سلول‌های آپوپتوتیک اولیه با هسته‌ی متراکم سبز کم‌رنگ و غشای سیتوپلاسمی سالم، از سلول‌های آپوپتوتیک تأخیری با هسته‌ی متراکم قرمز و قطعه قطعه قابل تفکیک بودند. سلول‌های نکروتیک نیز به رنگ زرد متمایل به قرمز و یک دست و بدون قطعه قطعه شدن هسته مشخص بودند و سلول‌های سالم نیز به رنگ سبز پررنگ دیده می‌شدند.

آنالیز آماری

در تمامی مراحل، هر آزمون ۳ بار تکرار شد و داده‌های به دست آمده به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) یا (One-way analysis of variance) و آزمون Tukey (HSD یا Honest significant difference نامیده می‌شود) استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها، سطح معنی‌دار آزمون‌ها $0.05 < P < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلونی‌ها با برنامه‌ی ImageJ شمارش شدند و برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزارهای Excel و Sigma Plot نسخه‌ی ۱۲ استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان بقای سلولی و مقدار IC_{50}

اثر ۳ کمپلکس جدید ۱، ۲ و ۳ بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ بررسی و میزان بقای سلولی از طریق MTT تعیین گردید. اساس MTT بر مبنای تبدیل

نمک تترازولیوم محلول به فورمازان نامحلول توسط میتوکندری‌های سلول‌های زنده می‌باشد. رسوب حاصل ارغوانی رنگ است. شدت رنگ ایجاد شده توسط دستگاه الیزا در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد سلول‌های زنده در هر چاهک با میزان جذب نوری (OD یا Optical density) خوانده شده توسط دستگاه الیزا ریدر متناسب می‌باشد.

درصد سلول‌های زنده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه با استفاده از فرمول $100 \times$ (جذب نوری سلول‌های شاهد \div جذب نوری سلول‌های مورد) محاسبه گردید. نتایج نشان داد که میزان حیات سلول‌های ۳ رده‌ی سلولی در محدوده‌ی غلظت‌های $0.125-64 \mu\text{g/ml}$ کمپلکس‌های جدید پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، روند کاهشی از خود نشان می‌دهند که این روند کاهشی، متناسب با دوز کمپلکس‌ها می‌باشد؛ به طوری که در دوزهای بالا، میزان حیات سلولی، کاهش زیادی را در مقایسه با دوزهای کمتر از خود نشان می‌دهند (شکل ۲) ($P < 0.05$).

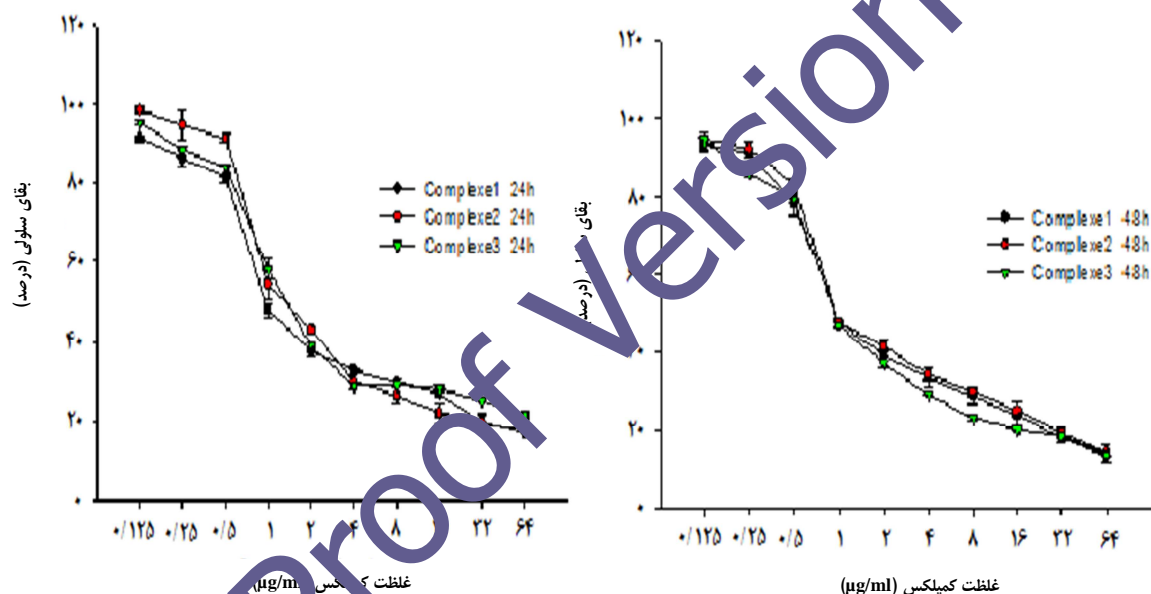
همچنین میزان IC_{50} از طریق روش‌های MTT (۲۴ و ۴۸ ساعته) و کلونی کانت مشخص و با سیس پلاتین مورد مقایسه قرار گرفت. مقدار IC_{50} کل برای کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ و سیس پلاتین به ترتیب برابر 0.120 ± 0.086 ، 0.24 ± 0.094 ، 1.07 ± 0.41 و 2.26 ± 0.26 بود. داده‌های به دست آمده از میزان IC_{50} این کمپلکس‌ها، نشان دهنده‌ی این نکته است که میزان IC_{50} به دست آمده از ۳ کمپلکس جدید از میزان IC_{50} به دست آمده از اثر سیس پلاتین بر روی رده‌ی سلولی مورد نظر، پایین‌تر

بود. همچنین رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ در بین ۳ کمپلکس جدید بیشتر به کمپلکس ۱ حساس‌تر می‌باشد (جدول ۱).

ارزیابی تعداد کلونی‌ها

شمارش تعداد کلونی‌های رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ که با دوزهای مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ به مدت ۷ روز تیمار شده بود، نشان داد که با افزایش غلظت این کمپلکس‌ها، تعداد کلونی‌هایی با بیش از ۵۰ سلول کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری در بین

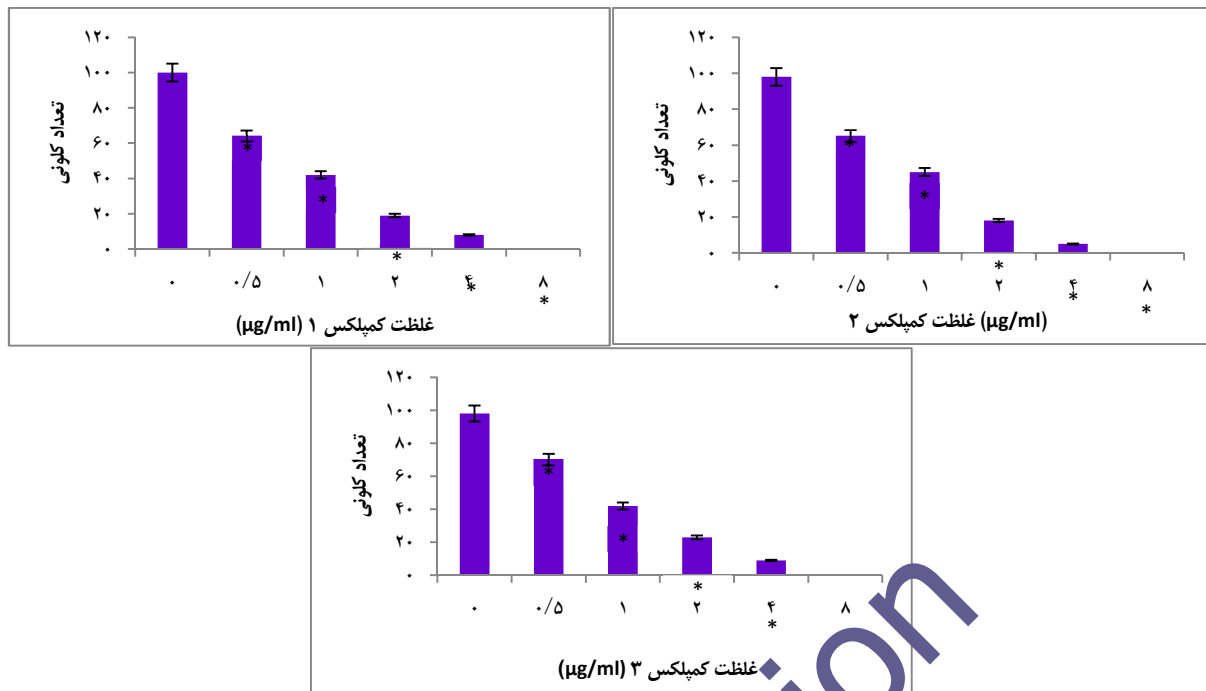
گروه‌های مورد در مقایسه با گروه شاهد که هیچ گونه تیماری دریافت نکرده بود، در هر ۳ کمپلکس ۱، ۲ و ۳ مشاهده گردید؛ به طوری که در سلول‌های تیمار شده با هر ۳ کمپلکس، تعداد کلونی‌ها در غلظت $0.5 \mu\text{g/ml}$ و بالاتر از آن کاهش یافت و در غلظت $8 \mu\text{g/ml}$ هیچ کلونی مشاهده نشد (شکل ۳). مقدار IC_{50} برای کمپلکس‌های ۱، ۲، ۳ و سیس پلاتین از طریق روش کلونی کانت محاسبه و نتایج در جدول ۱ آمده است.



شکل ۲. میزان بقای سلولی به دست آمده از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ توسط MTT (۲۴ و ۴۸ ساعته)، مقادیر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ می‌باشد.

جدول ۱. مقدار IC_{50} به دست آمده از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ و داروی سیس پلاتین بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ با روش MTT (۲۴ و ۴۸ ساعته) و کلونی کانت. مقادیر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ می‌باشند

کل IC_{50}	MTT (۲۴ ساعت)	MTT (۴۸ ساعت)	کلونی کانت	
0.86 ± 0.20	0.87 ± 0.11	0.89 ± 0.25	0.83 ± 0.23	کمپلکس ۱
0.94 ± 0.24	1.02 ± 0.20	0.95 ± 0.31	0.85 ± 0.20	کمپلکس ۲
1.07 ± 1.17	1.05 ± 0.23	1.06 ± 0.22	1.08 ± 0.05	کمپلکس ۳
2.26 ± 0.41	1.79 ± 0.30	2.00 ± 0.46	2.98 ± 0.47	سیس پلاتین

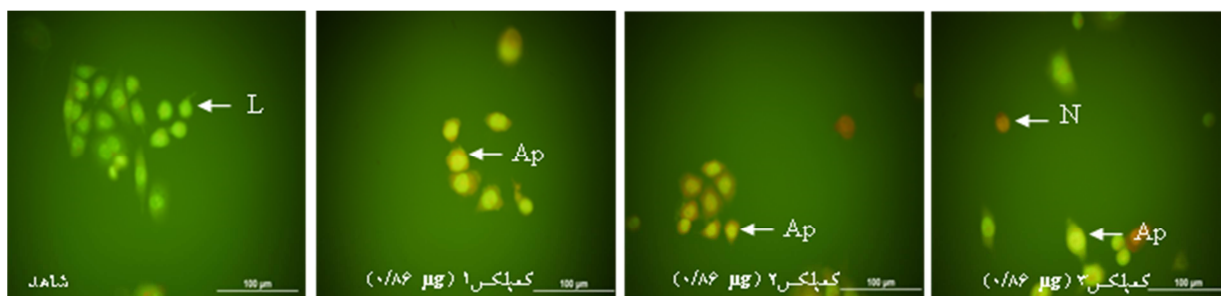


شکل ۳. این نمودار تأثیر رقت‌های مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ بر روی تعداد کلونی‌های رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ را نشان می‌دهد (* $P < 0.001$)

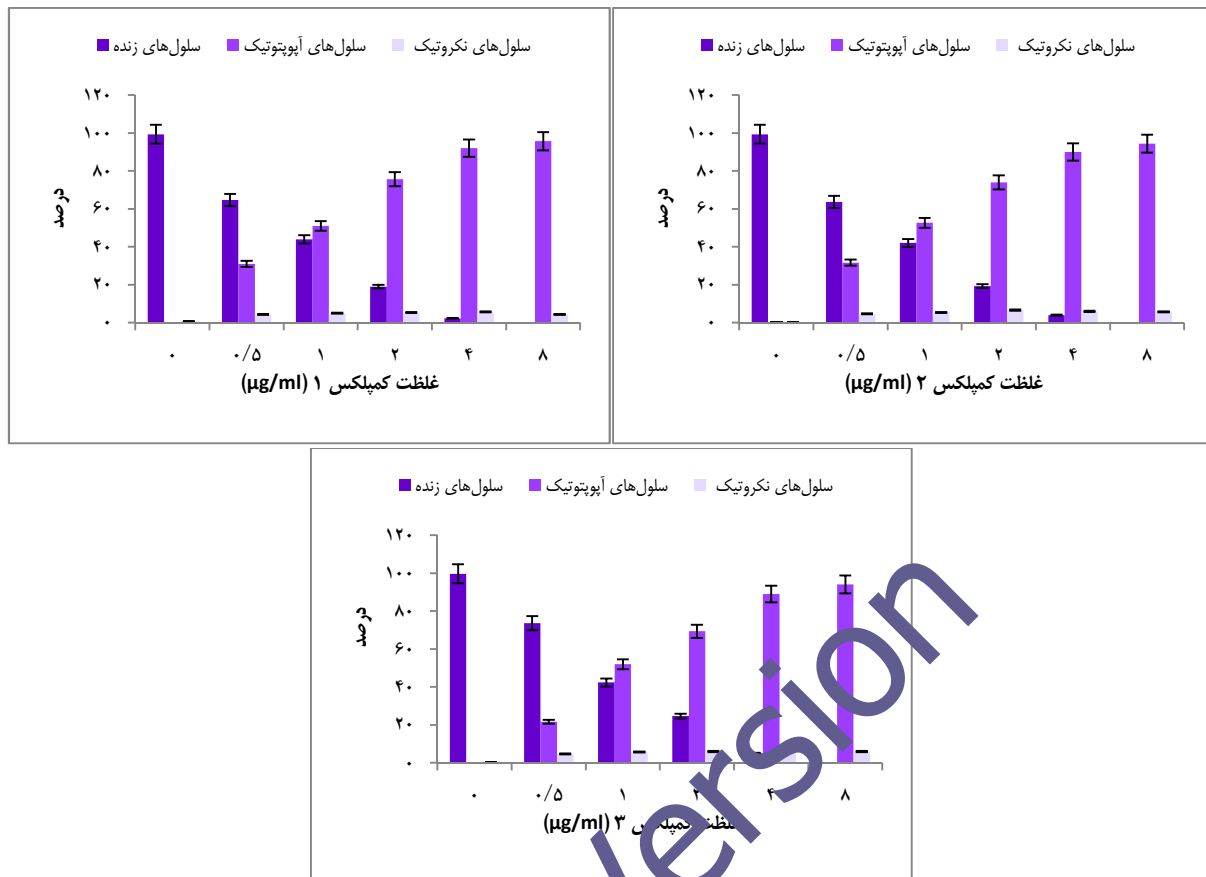
بررسی مرگ سلولی

مشاهده گردید. هسته‌ی سلول‌های نکروتیک نیز با رنگ تمایز از دیگر سلول‌ها قابل تفکیک بود (شکل ۴). بعد از این رنگ‌آمیزی، تعداد سلول‌های زنده و آپوپتوتیک و نکروتیک مورد شمارش قرار گرفت. نتایج، گریز افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های آپوپتوتیک بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت این کمپلکس‌ها بر تعداد سلول‌های آپوپتوتیک افزوده و از تعداد سلول‌های زنده کاسته شد (شکل ۵).

برای بررسی نوع مرگ سلولی ناشی از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ از روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم برمایند استفاده گردید. بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌های تیمار شده با کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳، سلول‌هایی با هسته‌ای زرد رنگ و دارای تغییرات مورفولوژیک از جمله تراکم و قطعه قطعه شدن هسته که دارای اجسام آپوپتوتیک بودند،



شکل ۴. رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم برومایند رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ تیمار شده با دوز IC₅₀ کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳: L: سلول‌های زنده، Ap: سلول‌های آپوپتوتیک، N: سلول‌های نکروتیک. مقادیر بر حسب µg/ml می‌باشد



شکل ۵. مقایسه درصد سلول‌های زنده، آپپتوتیک و نکروتیک در رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ تیمار شده با غلظت‌های مختلف کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳

این به سبب آسیب به بافت‌های سالم بدن آسیب می‌زند. این محدودیت‌ها باعث شده است تلاش‌هایی جهت ساخت داروهایی بر پایه پلاتین یا پالادیوم انجام شود که نسبت به سلول‌های طبیعی، دارای سمیت کم و نسبت به سلول‌های سرطانی، قدرت تخریبی بالا داشته باشند.

یکی از استراتژی‌های کاهش اثرات جانبی ترکیبات حاوی فلزات سنگین، استفاده از کمپلکس‌های حاوی لیگاند شلاته کننده دی‌اتیل دی‌تیو کربامات می‌باشد که این لیگاندها باعث کاهش اثرات سمی فلزات سنگین بر سلول‌های کلیه و دیگر بافت‌های بدن می‌شوند (۲). مزیت کمپلکس‌های

بحث

از جمله ترکیباتی که به عنوان دارو در شیمی درمانی علیه سلول‌های بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توان به کمپلکس‌های حاوی فلزات سنگین نظیر پلاتین، پالادیوم، اسمیوم و ایریدیوم (Iridium) اشاره کرد (۴-۲). مطالعات دکتر ترشیزی و همکاران نشان داد که کمپلکس‌های ۲ و ۲'-بای پیریدین بوتیل دی‌تیو کربامات پلاتینیوم (II) و پالادیوم (II) با DNA واکنش می‌دهند و در غلظت پایین ($100 \mu\text{mol}$) باعث دناتوره شدن DNA سلول‌های رده‌ی سلولی K562 می‌شود (۲۰). با این حال، استفاده از این داروها، محدودیت‌های قابل توجهی دارد؛ به لحاظ

جدید مورد استفاده در این مطالعه، وجود ریشه‌های دی‌تیو کربامات است که بنا به گزارش‌ها، باعث کاهش اثرات جانبی فلزات سنگین می‌شود و همچنین فلز پالادیوم به کار رفته در این کمپلکس‌ها نیز دارای اثرات جانبی کمتری به نسبت فلز پلاتین می‌باشد. در این مطالعه، کمپلکس‌های پالادیوم طبق روش مشابهی که رفرنس داده شده است، در آزمایشگاه ساخته شد (۸).

داده‌های به دست آمده از میزان IC_{50} این کمپلکس‌ها نشان داد که کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ دارای اثرات بالقوه سمی بر روی رده‌ی سلولی KYSE-۳۰ هستند و میزان IC_{50} به دست آمده از اثر این ۳ کمپلکس جدید بر روی رده‌ی سلولی، از میزان IC_{50} به دست آمده از اثر سیس پلاتین بر روی این رده‌ی سلولی پایین‌تر می‌باشد. همچنین اثر کمپلکس ۱ بر روی این رده‌ی سلولی، بهتر از سایر کمپلکس دیگر و مقدار IC_{50} برای کمپلکس ۱ برابر $0.086 \pm 0.020 \mu g/ml$ می‌باشد. با توجه به این که این ۳ کمپلکس در اندازه‌ی مولکولی با هم اختلاف دارند و کمپلکس ۱ کشیدگی مولکولی کمتری در مقایسه با ۳ کمپلکس دیگر دارد؛ این احتمال وجود دارد که اندازه‌ی مولکول نیز در اتصال کارآمد به DNA و سایتو توکسیسته نقش داشته باشد.

در مطالعه‌ی مشابهی، منصوری ترشیزی و همکاران تأثیر دو کمپلکس جدید پلاتینیوم و پالادیوم را روی رده‌ی سلولی K۵۶۲ بررسی و آن را با سیس پلاتین مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که این دو ترکیب، اثرات ضد سرطانی بیشتری نسبت به سیس پلاتین دارند. سلول‌های این رده، حساسیت متفاوتی را در مقابل این دو کمپلکس ستر شده نشان دادند (۹). در مطالعه‌ای که توسط آریان‌پور و همکاران انجام

شد، ۳ کمپلکس پالادیوم جدید روی ۳ لاین سلولی کبد، ریه و تخمدان مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه با سیس پلاتین مقایسه گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که رده‌ی سلولی A۵۴۹ بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(Bu-dtc)]Cl$ و رده‌ی سلولی سرطان کبد (HepG۲) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(hex-dtc)]Cl$ از خود نشان داد. همچنین رده‌ی سلولی سرطان تخمدان (OV۲۰۰۸) بیشترین حساسیت را در مقابل کمپلکس $[Pd(bpy)(Bu-dtc)]$ از خود نشان داد (۲).

همچنین مطالعه‌ی دیوسالار و همکاران، نشان داد که مقدار IC_{50} به دست آمده از اثر کمپلکس $2,2'-bipyridin ButylglycinatoPt(II) nitrate$ بر روی لاین سلولی K۵۶۲ بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه بیشتر از $100 \mu mol$ می‌باشد (۱۰).

در مطالعه‌ی Tayyem و همکاران اثر ضد سرطانی چهار کمپلکس جدید فلزی متشکل از پلاتین و پالادیوم با فرمول عمومی $trans-PtCl(NH_3)_2\{trans-Pt(NH_3)_2\}_n$ (که در آن $n = 4-7$) می‌باشد را بر روی سرطان‌های تخمدان ($A2780$ ، $A2780cisR$ ، $A2780ZD0471$)، ملانوما ($Me-10538$) و ریه ($NCIH460$) بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این ۴ کمپلکس جدید، بیشترین اثر را در مقابل سرطان تخمدان دارند و در بین این ۴ کمپلکس، اثر کمپلکس $trans-PtCl(NH_3)_2\{trans-Pt(NH_3)_2\}_4$ از بقیه بهتر می‌باشد. مقدار IC_{50} برای این کمپلکس در رده‌های سلولی $A2780cisR$ ، $A2780$ و

$0.473 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ به ترتیب برابر 0.48×10^{-4} و 0.23×10^{-4} می‌باشد (۱۱).

در مطالعه‌ی Gao و همکاران مشاهده شد که کمپلکس فلزی سنتز شده با فرمول H_2O [Pd(bpy)(bmal)] که در آن $\text{bpy} = 2,2'$ و $\text{bmal} = \text{benzylmalonate}$ می‌باشد، اثرات سایتوتوکسیک در برابر رده‌ی سلولی سرطان ریه (AGZY-۸۳) از خود نشان می‌دهد ($\text{IC}_{50} = 55/4 \mu\text{g/ml}$) (۱۲).

برای بررسی نوع مرگ سلولی ناشی از اثر کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ بر روی این رده‌ی سلولی، از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج-اتیدینام به‌ماید استفاده گردید که نتایج نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌های آپتوتیک می‌باشد؛ به طوری که با افزایش غلظت این کمپلکس‌ها، بر تعداد سلول‌های آپتوتیک افزوده و از تعداد سلول‌های زنده کاسته شد. نکروز و آپپتوز دو روش مجزای مرگ سلولی می‌باشند. آپپتوز همانند تمایز و تکثیر سلولی یکی از روش‌های مهم کنترل سلولی محسوب می‌گردد و هر گونه اختلال در آن، منجر به رشد غیر طبیعی سلول‌ها می‌شود (۱۳).

آپپتوز به عنوان مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول نیز خوانده می‌شود (۱۳-۱۴). بر خلاف آپپتوز، نکروز مرگ پاتولوژیک سلول است که در طی آسیب‌های شدید به سلول رخ می‌دهد (۱۵-۱۶). در این مطالعه، کمپلکس‌های ۱، ۲ و ۳ توانایی بالایی در توقف چرخه‌ی سلولی و القای آپپتوز از خود نشان دادند. از آن جا که آپپتوز یک مکانیسم دفاعی سلول در برابر سرطانی شدن است و با توجه به این که اختلال در این فرایند به عنوان یک عامل مهم در

ایجاد و گسترش سرطان به شمار می‌آید، اثر کمپلکس‌های جدید پالادیوم در القای آپپتوز می‌تواند حایز اهمیت باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Kontek و همکاران انجام شد، آن‌ها نشان دادند که کمپلکس جدید سنتز شده‌ی پالادیوم با فرمول عمومی $[\text{PdCl}_2(2\text{-pmOpe})_2]$ trans دارای phosphates $\text{diethyl(pyridine-2-ylmethyl)}$ در ساختمان خود می‌باشد اثرات سایتوتوکسیک بالایی در برابر رده‌های سلولی سرطانی ($\text{IC}_{50} = 103/8 \mu\text{M}$) A549 و ($\text{IC}_{50} = 150 \mu\text{M}$) HT29 در مقایسه با نفوسیت‌های طبیعی خون انسان ($\text{IC}_{50} = 242/5 \mu\text{M}$) از خود نشان می‌دهند. در تمام رده‌های سلولی این کمپلکس قادر به القای آپپتوز و نکروز در سلول‌ها می‌باشد (۱۷).

غلظت بالای یون کلرید در دستگاه گوارش، موجب غیر فعال شدن سیس پلاتین و کاهش اثرات ضد سرطانی آن می‌شود، اما به خاطر این که این کمپلکس جدید با یون کلرید موجود در دستگاه گوارش واکنش نمی‌دهد و غیر فعال نمی‌شوند، می‌توانند کاندیدای بهتری برای درمان تومورهای موجود در این نواحی باشند. همچنین انتظار می‌رود این کمپلکس‌های جدید در مقایسه با سیس پلاتین، اثرات سمی کمی بر روی سلول‌های کلیه داشته باشند؛ چرا که آن‌ها با گروه‌های سولفیدریل سلول‌های توبول‌های کلیه واکنش نشان نمی‌دهند (۱۸).

در پایان می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کمپلکس‌های جدید پالادیوم، تأثیرات بیشتری در مقایسه با سیس پلاتین روی مرگ سلولی سلول‌های سرطانی مری در شرایط *in vitro* از خود نشان

تحقیقات دانشجویی و مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل و مدیریت محترم گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه قدردانی نمایند. مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی ثبت شده در شورای پژوهشی دانشکده‌ی پزشکی اردبیل می‌باشد.

می‌دهند و این کمپلکس‌ها می‌توانند بعد از مطالعات *In vivo* و همچنین انجام تحقیقات تکمیلی، به عنوان جایگزین مناسبی برای درمان سرطان معده، کبد و مری محسوب شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کمیته‌ی

References

1. Foltinova V, Svihalkova Sindlerova L, Horvath V, Sova P, Hofmanova J, Janisch R, et al. Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12, new Pt (IV)-based drugs. A Minireview. Scripta Medica (BRNO) 2008; 81(2):105-16.
2. Aryanpour N, Mansouri-Torshizi H, Nakhjavan M, Shirazi H. Cytotoxicity of Diimine Palladium (II) Complexes of Alkylthiocarbamate Derivatives on Human Lung, Ovary and Liver Cells. Iran J Pharm Res 2012; 11(2): 689-95.
3. Balcerzak M. Sample digestion methods for the determination of traces of precious metals by spectrometric techniques. Anal Sci 2002; 18(7): 737-50.
4. Tusek-Bozic L, Juribasic M, Traldi P, Sarcia V, Furlani A. Synthesis, characterization and antitumor activity of palladium(II) complexes of monoethyl 8-quinolylmethylphosphonate. Polyhedron 2008; 27(4): 1517-28.
5. Barnes KR, Kutikov A, Lipper SJ. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a series of estrogen-tethered platinum(IV) complexes. Chem Biol 2004; 11(4): 557-64.
6. Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. Cancer Res 2002; 62(22): 6559-65.
7. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. Anticancer Agents Med Chem 2007; 7(1): 3-18.
8. Mansouri-Torshizi H, Saeidifar M, Divsalar A, Saboury AA. Interaction studies between a 1,10-phenanthroline adduct of palladium(II) dithiocarbamate anti-tumor complex and calf thymus DNA. A synthesis spectral and in-vitro study. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2010; 77(1): 312-8.
9. Mansouri-Torshizi H, Moghaddam M, Divsalar A, Saboury AA. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. Bioorg Med Chem 2008; 16(21): 9616-25.
10. Divsalar A, Saboury AA, Ahadi L, Zemanatiyar E, Mansouri-Torshizi H. Investigation of effects of newly synthesized Pt(II) complex against human serum albumin and leukemia cell line of K562. BMB Rep 2010; 43(11): 766-71.
11. Tayyem H, Huq F, Yu JQ, Beale P, Fisher K. Synthesis and activity of a trinuclear platinum complex: [{trans-PtCl(NH₃)₂}₂μ-{trans-Pt(3-hydroxypyridine)₂(H₂N(CH₂)₆NH₂)₂}]Cl₄ in ovarian cancer cell lines. ChemMedChem 2008; 3(1): 145-51.
12. Gao EJ, Wang KH, Gu XF, Yu Y, Sun YG, Zhang WZ, et al. A novel binuclear palladium complex with benzothiazole-2-thiolate: synthesis, crystal structure and interaction with DNA. J Inorg Biochem 2007; 101(10): 1404-9.
13. Macdonald F, Ford C, Casson A. Molecular biology of cancer Florence, Kentucky: Taylor and Francis; 2004.
14. Neves I, Jr., Bertho AL, Veloso VG, Nascimento DV, Campos-Mello DL, Morgado MG. Improvement of the lymphoproliferative immune response and apoptosis inhibition upon in vitro treatment with zinc of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV+ individuals. Clin Exp Immunol 1998; 111(2): 264-8.
15. Armitage D, Wilkinson G, Stone F, Abel E. Comprehensive organometallic chemistry. New York, NY: Pergamon Press; 1982. vol 2. p.99.
16. Gordon JA. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. Methods

- Enzymol 1991; 201: 477-82.
17. Kontek R, Matlawska-Wasowska K, Kalinowska-Lis U, Kontek B, Ochocki J. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells in vitro. Acta Pol Pharm 2011; 68(1): 127-36.
18. Zhao G, Sun H, Lin H, Zhu S, Su X, Chen Y. Palladium(II) complexes with N,N'-dialkyl-1,10-phenanthroline-2,9-dimethanamine: synthesis, characterization and cytotoxic activity. J Inorg Biochem 1998; 72(3-4): 173-7.

Proof Version

Cytotoxicity of Newly Synthesized Pd (II) Complexes on Esophageal Cancer Cell Line (KEYSE-30)

Nowruz Najafzadeh PhD¹, Sharam Hadizadeh PhD², Mohammad Mazani PhD³,
Mojtaba Amani PhD⁴, Hassan Mansouri Torshizi PhD⁵

Original Article

Abstract

Background: Surgery, radiation therapy, drug therapy or a combination of these methods can be used for the treatment of malignancies. Drug therapy in cancer patients includes of chemotherapy, Biotherapy and use of monoclonal antibodies against antigens of malignant cells. One of the compounds that was used as drugs in chemotherapy against malignant cells, are heavy metal complexes. The present study aimed to assess the effects new anticancer palladium complexes have been performed on esophageal cancer cells.

Methods: New palladium complexes, namely [(phen) Pd (μ-al-bis-dtc) Pd (phen)] (NO₃)₂ (where alkylenebisdithiocarbamate, al-bis-dtc= propylenebisdithiocarbamate (pn-bis-dtc, 1); butylenebisdithiocarbamate (bu-bis-dtc, 2); octylenebis- dithiocarbamate (oc-bis-dtc, 3) and phen=1,10-phenanthroline) was synthesized in the laboratory of Chemistry, University of Sistan and Baluchestan. In order to investigate the anticancer effects of three new complexes compared to cisplatin on esophageal cancer cell line (KYSE-30), cytotoxicity was examined through MTT and clonogenic assays. Ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining was used for apoptotic and necrotic cells detection.

Findings: The results of MTT and clonogenic assay showed that the IC₅₀ value obtained from cells treated with complexes 1, 2 and 3 were much lower than cisplatin and also Ethidium bromide/acridine orange staining demonstrated that three new Complexes apply its cytotoxic effect via apoptotic pathway. Comparing the number of colonies formed after treatment with various concentrations of palladium complexes, showed significant differences compared with control. (P < 0.001).

Conclusion: Findings of this study showed that anti-tumor effect of three new Complexes on KYSE-30 cell line were higher than that of cisplatin. And even the use of low concentrations of palladium complexes can reduce the number of colonies and induces cell death by apoptosis and if it can do further researches later be used as an alternative drug in the treatment of esophageal cancer.

Keywords: KEYSE-30, New palladium complexes, Colony assay, Apoptosis, Necrosis

Citation: Najafzadeh N, Hadizadeh Sh, Mohammad Mazani M, Amani M, Mansouri Torshizi H. Cytotoxicity of Newly Synthesized Pd (II) Complexes on Esophageal Cancer Cell Line (KEYSE-30). J Isfahan Med Sch 2014; 32(294): ??.

1- Assistant Professor, Department of Anatomy and Pathology, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

2- MSc Student, Department of Biochemistry, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

3- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

4- Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Medicine and Allied Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

5- Assistant Professor, Department of Chemistry, School of Basic Sciences, University of Sistan and Balochestan, Zahedan, Iran

Corresponding Author: Sharam Hadizadeh PhD Email: shahramhadizadeh@yahoo.com